

Die Medusenentwicklung von *Podocoryne carnea* M. Sars
(Hydrozoa) unter der Wirkung von Actinomycin D
und Puromycin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
JOSEF ACHERMANN
von Richenthal (LU)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. Tardent

Zürich 1978

1979



Sonderdruck aus Zool. Jb. Physiol. Bd. 82, S. 441—464 (1978). Verlag: VEB Gustav Fischer Verlag, DDR - 69 Jena, Villengang 2. Veröffentlicht unter der Lizenznummer 1071 des Presseamtes beim Vorsitzenden des Ministerrates der Deutschen Demokratischen Republik. Alle Rechte beim Verlag. Nachdruck (auch auszugsweise) nur mit Genehmigung des Verlages und des Verfassers sowie mit der Angabe der Quelle gestattet. Printed in the German Democratic Republic.

Die Medusenentwicklung von *Podocoryne carnea* M. Sars (Hydrozoa)
unter der Wirkung von Actinomycin D und Puromycin

**The Development of the Medusa of *Podocoryne carnea* M. Sars
(Hydrozoa) under the Influence of Actinomycin D and Puromycin**

Von JOSEF ACHERMANN

Mit 7 Abbildungen

Abstract

Medusa buds of *Podocoryne carnea* M. Sars (Hydrozoa) were isolated and treated with Actinomycin or Puromycin which favoured the transformation of the buds into stolons and later into polyps. Untreated controls, in contrast, developed into functional medusae. During this transformation the different ectodermal, subumbrellar tissues first fuse, then the cells dedifferentiate and in later stages are seen in the former ectodermal exumbrella. In Actinomycin treated buds transformation is delayed with comparison to those buds treated with Puromycin, however no histological differences were observed. This transformation can be induced by Puromycin up to the late stage 8, whereas Actinomycin is not effective beyond the early stage 8. This confirms the results of SCHMID (1972), that from the stage 8—9 onward typical structures of the medusa are irreversibly stabilized in their further development. While protein synthesis is needed for the development of this stabilization, the synthesis seems not to be necessary for the maintenance of it. Medusae differentiating from Actinomycin treated buds (stage 8 and 9) usually exhibit anatomical anomalies and a prolonged differentiation time. Comparable observations were made when isolated buds were treated during the swelling process of the outer mesoglea (stage 8—9) with low concentrations of Puromycin. If the same treatment is stopped before this process occurs, medusae exhibit no anomalies. Therefore after the swelling process, which seems to be important for the stabilization of the medusa typical structures (SCHMID 1972), the development of organs can not be affected anymore. Further investigations are needed to determine whether that inhibition plays a part in the aging process of the medusa.

Einleitung

Im Rahmen des Generationswechsels von *Podocoryne carnea* M. Sars (Hydrozoa, Anthomedusa) wie in jenem vieler anderer Hydroiden entsteht die Erscheinungsform der freischwimmenden Meduse durch einen blastogenetischen bzw. vegetativen Entwicklungsprozeß aus dem Polypenstadium (KÜHN 1914; BERRILL 1953; AVSET 1961; FREY 1968; KAKINUMA 1969; SCHMID 1972; TARDENT 1978). Es ist dies ein echter Differenzierungsvorgang, da in dessen Verlauf eine vom Polypen anatomisch und histologisch in jeder Hinsicht verschiedenartige Erscheinungsform entsteht (BOELSTERLI 1977).

Dieses Differenzierungsgeschehen ist noch bis zu einem Stadium, in dem die medusentypischen Strukturen und Zelltypen schon weitgehend differenziert sind, reversibel, wandeln sich doch vom polypoiden Gonozoid isolierte Medusenanlagen wieder zu

Stolonen und im besten Fall zu Polypen um (FREY 1968; KAKINUMA 1969; SCHMID 1972). Diese mit zellulärer Metaplasie verbundene Transformation wird bei *Podocoryne* im Falle jüngerer Stadien durch die Isolation der Medusenknospen eingeleitet (FREY 1968), während es bei älteren Stadien zur Erreichung des gleichen Ziels einer zusätzlichen Traumatisierung (SCHMID 1972) der Isolate bedarf. Hat die Anlage einmal das Stadium 9 (FREY 1968) ihrer Entwicklung erreicht, kann das Differenzierungs-geschehen mit keinem der bisher geprüften Verfahren mehr rückgängig gemacht werden (SCHMID 1972). Jenseits dieser Schwelle, von der an der medusentypische Differenzierungszustand der Anlage als Ganzes durch noch unbekannte Faktoren eine endgültige Stabilisierung erfährt, lassen sich jedoch einzelne Zelltypen, wie z. B. isolierte, quergestreifte Muskelzellen der Medusensubumbrella, zum metaplastischen Funktionswandel veranlassen (SCHMID 1974; 1975; 1976). Dieser Befund stellt einen Hinweis dafür dar, daß die Wirksamkeit des stabilisierenden Faktors oder Faktorenkomplexes an die weitgehende strukturelle Integrität des Medusen-Primordiums gebunden ist.

In Anbetracht der Tatsache, wonach sich im Verlaufe der blastogenetischen Medusenentwicklung ein neues, vom Polypen verschiedenes Zellinventar heranbildet, darf angenommen werden, daß diese Phase des Generationswechsels mit einer intensiven Neusynthese von Medusen-spezifischen Proteinen verbunden ist. Die vorliegende Arbeit prüft, ob und in welchem Ausmaß eine Störung dieser Syntheseprozesse auf dem Niveau der Transcription bzw. Translation die Differenzierung der Medusenanlage beeinträchtigt und ob als Folge davon die Tendenzen zur Transformation der Anlagen in Stolonen eine Förderung erfahren, eventuell sogar jenseits der erwähnten Schwelle (Stadium 9). Zu diesem Zwecke wurde das morphogenetische Verhalten verschieden alter Medusenknospen von *Podocoryne carnea* M. SARS in Anwesenheit des transcriptionshemmenden Actinomycin D (REICH et al. 1964) und des translationshemmenden Puromycins (NATHANS 1967) untersucht.

Material und Technik

1. Material:

Für die Versuche wurden Medusenknospen der Anthomeduse *Podocoryne carnea* M. SARS (Hydractiniidae) verwendet, die, ursprünglich aus dem Mittelmeer stammend, in künstlichem Meerwasser (Wiegandt, Meeresaquaristik, Krefeld) bei 16 °C und einem tageszeitlichen hell-dunkel Wechsel gezüchtet wurden. Von isolierten Einzelpolypen ausgehend, wurden in Halbrundschalen (Inhalt: 20–30 ml) Klone angesetzt, wobei die Schalen zur Verhinderung einer störenden Sedimentation in einer besonderen Haltevorrichtung senkrecht in ein 100 Liter fassendes, durchlüftetes Aquarium gestellt wurden. Die Klone wurden in Abständen von 2 Tagen reichlich mit Larven von *Artemia salina* gefüttert. Alle für die Versuche ausgewählten Polypen bzw. Medusenknospen entstammten ein und demselben Klon.

Die für die Behandlung der Medusenknospen bestimmten Lösungen von kaltem Actinomycin D (Cosmogen, Dactinomycin; Merck, Sharp & Dohme) bzw. Puromycin (Dihydrochlorid; Sigma) wurden vor jedem Versuch, ausgehend von jeweiligen Stammlösungen (25 mg/10 ml Meerwasser), neu zubereitet. Zur Überprüfung der Inkorporation des Actinomycins durch die isolierten Knospen wurden diese in H^3 -Actinomycin-D (Radiochemical Centre, Amersham; MG: 1255, spez. Aktiv.: 5,6 mCi/mg) inkubiert.

2. Technik:

Die für die Behandlung bestimmten Medusenknospen wurden mit einer Pinzettenschere von den Geschlechtspolypen (Gonozoid) der Kolonie getrennt, gemäß den von FREY (1968) definierten Entwicklungsstadien sortiert und, nach Eliminierung der verletzten Exemplare, zu je 20–30 Stück in Halbrundschalen (20–30 ml) isoliert (Versuchtemperatur 16 °C). Diese waren entweder mit Meerwasser (Kontrollen) oder Actinomycin- bzw. Puromycinlösungen beschickt. (Die Actinomycinversuche wurden zwecks Verhinderung eines Aktivitätsverlustes unter Lichtabschluß durchgeführt.)

Je nach Versuchsanordnung wurden die mit Actinomycin bzw. Puromycin behandelten Knospen in verschiedenen Zeitabständen (6, 12 oder 24 h) nach Versuchsbeginn wieder in normales Meerwasser überführt. Für die Beurteilung der Auswirkung der Antibiotika auf den Entwicklungsverlauf der Isolate war eine laufende, möglichst genaue Identifikation des Entwicklungszustandes erforderlich, die in Abständen von 24 h und gestützt auf die von FREY (1968) für lebende Knospen aufgestellten Kriterien vorgenommen wurden. Damit konnte für jede Medusenknospe neben dem Entwicklungsverlauf gleichzeitig die Zeit registriert werden, die sie unter den gegebenen Bedingungen als Kontrolle oder in der Actinomycin- bzw. Puromycinlösung entweder für die Differenzierung zur Meduse (Tabelle 1; 2) oder für den Transformationsprozeß (Tabelle 3) benötigte.

Die für histologische Untersuchungen bestimmten Kontrollen und behandelten Medusenknospen wurden sofort bzw. 12, 42, 48, 72, 96 und 144 Stunden nach ihrer Isolation vom Gonozoid fixiert (2 h in 4,5 % Glutaraldehyd und 1 h in OsO_4) und in Epon eingebettet. Die 5 μm dicken Schnitte wurden mit Toluidinblau (Konz.: 0,1 %) gefärbt und mit Epon überschichtet.

Bei den H^3 -Actinomycinversuchen wurden isolierte Medusenknospen des Stadiums 7 (FREY 1968) während 2–12 h in 50 $\mu\text{Ci/ml}$ H^3 -Actinomycin-D inkubiert, anschließend 12 h in reinem Meerwasser gewaschen und nach dem oben erwähnten Verfahren für die autoradiographische Untersuchung weiterverarbeitet. Die 5 μm dicken Schnitte wurden hierfür mit einem Kodak-Stripping-Film überschichtet und nach 12–18tätiger Exposition bei 4 °C in Kodak D 19 entwickelt und mit Hämalaun nachgefärbt.

Ergebnisse

1. Konzentrationsversuche

Weil Zellen und Zellverbände verschiedener Herkunft unterschiedlich auf die Wirkung von Actinomycin und Puromycin reagieren (BRACHET et al. 1964; CLARKSON 1969; LESH-LAURIE et al. 1972), waren Vorversuche zur Ermittlung der oberen und unteren Grenzkonzentrationen sowie der idealen Behandlungsdauer notwendig. Dabei ließen wir verschiedene Konzentrationen (siehe unten) beider Antibiotika während 6, 12 und 24 Stunden auf frisch isolierte Medusenknospen des Stadiums 7 einwirken und verglichen deren Entwicklungsleistungen mit gleichzeitig überwachten, unbehandelten Kontrollisolaten.

Actinomycin: Die während der oben erwähnten Behandlungszeiten in 3 Einzelversuchen geprüften Konzentrationsreihen (2, 5, 10, 15, 20, 25 μg Actinomycin/ml Meerwasser) führten mit zunehmendem Wirkungsgrad zu folgenden qualitativen Ergebnissen:

1. Die medusentypische Entwicklung lief, allerdings mit einer im Vergleich zu den Kontrollen manifesten Verzögerung (Tabelle 1) bis zur Verwirklichung der ausdifferenzierten Medusen weiter, wobei diese jedoch bereits bei niedrigen Konzentrationen (Abb. 1) mit Mißbildungen und Fehlern behaftet sein konnten (Abb. 3c/d).

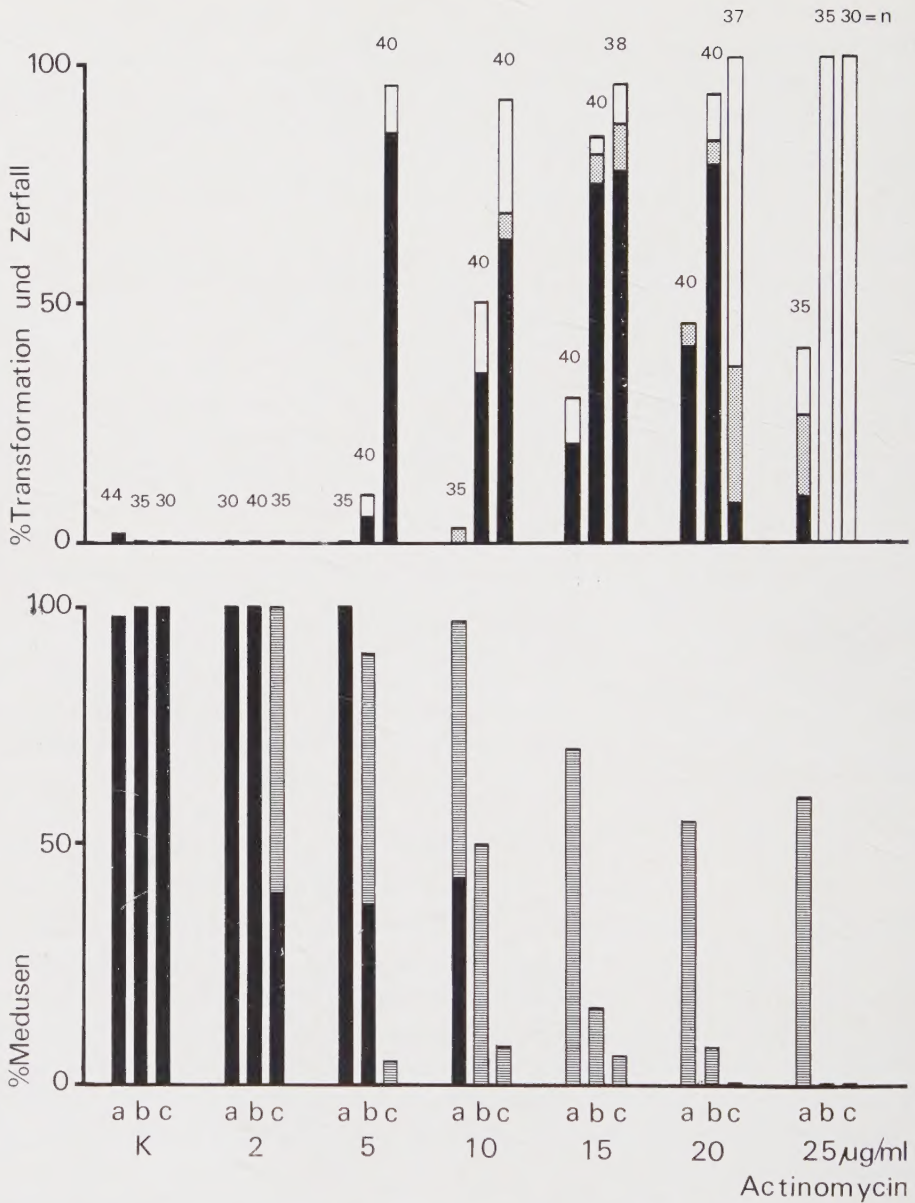


Abb. 1. a) Prozentualer Anteil isolierter Medusenknospen, die sich nach einer Behandlung mit verschiedenen Actinomycinkonzentrationen (2–25 µg/ml) während 5 (a), 12(b) oder 24(c) Stunden: 1. zu Stolonen umwandeln = Transformation (schwarze Säule), 2. sich bis zum Kugelstadium dedifferenzieren (punktirte Säule) oder 3. zerfielen (weiße Säule), verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe (K).

b) Prozentualer Anteil isolierter Medusenknospen, die sich zu vollständig (schwarze Säule) oder fehlerhaft entwickelten Medusen (gestrichelte Säule) differenzierten (reziproke Werte zu 1a).

2. Die Isolate durchliefen, nachdem sie sich meist ein Stadium in medusentypische Richtung weiterentwickelt hatten, den von FREY (1968) und SCHMID (1972) beschriebenen Transformationsprozeß, in dessen Verlauf sich die isolierten Medusenknospen in Stolone umwandelten.

3. Die mit dem Transformationsprozeß (siehe 2.) verbundene Dedifferenzierung der Medusenknospen blieb nach Erreichen des Kugelstadiums (FREY 1968) auf halbem Weg stehen, so daß sie sich selbst nach einer Beobachtungsdauer von 260 h nicht zu Stolonen weiterentwickelt hatten. Ein derartiger Stopp des Transformationsprozesses wurde bei den Kontrollisolaten nie beobachtet.

4. Die isolierten Knospen desintegrierten unter der Wirkung relativ hoher Actinomycin-Konzentrationen, wobei sie sich bald nach Behandlungsbeginn in weißliche Kugeln verwandelten, die, zunächst in Einzelzellen zerfallend, sich dann auflösten.

Bei den Isolaten, die den unter 2. erwähnten Transformationsprozeß durchliefen, konnte hingegen die strukturelle und zelluläre Umformung auch histologisch verfolgt werden (siehe Kap. 3.3.).

Die im Stadium 7 isolierten Kontrollknospen der Actinomycinversuche entwickelten sich ausnahmslos zu zwar verkleinerten, jedoch vollständigen Medusen, die in keinem Falle Mißbildungen zeigten und somit den von FREY (1968) und SCHMID (1972) gemachten Beobachtungen entsprachen.

Den Resultaten (Abb. 1) dieser Konzentrationsversuche ist unter Berücksichtigung des soeben erwähnten Wirkungsspektrums zu entnehmen, daß das morphogenetische Verhalten der behandelten Versuchsknospen sich bei der niedrigsten Konzentration ($2 \mu\text{g}$ Actinomycin/ml Meerwasser) nicht von dem der Kontrollknospen unterschied, bei der höchsten Konzentration ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) jedoch bald nach Behandlungsbeginn zerfielen. Zwischen diesen Extremen erreichte die Transformationsrate nach der 24stündigen Behandlung bei 5, nach der 12stündigen bei 15 und $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomycin ihr Maximum, während bei der 6stündigen Exposition die Reaktion der Versuchsknospen wesentlich geringer war.

Da die isolierten Knospen von einer dünnen Peridermhülle umschlossen sind, stellen sich die methodisch bedeutsamen Fragen, mit welcher Geschwindigkeit das im Meerwasser angebotene Actinomycin in die darin inkubierten Medusenknospen eindringt, bzw. ob in diesen eine differentielle, d. h. regionale Inkorporation des Agens stattfindet (vgl. LESH-LAURIE 1974). Zur Klärung dieser Frage wurden isolierte Knospen des Stadiums 7 in H^3 -Actinomycin inkubiert und anschließend, d. h. nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden Behandlungszeit, für die autoradiographische Untersuchung weiterverarbeitet. Von den zuvor getesteten H^3 -Actinomycin-Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 20, $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ Meerwasser) ergab $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$, das einer Actinomycin-Konzentration von $8,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht, die besten Markierungsergebnisse.

Bereits nach 2stündiger Exposition der Knospen war in den Präparaten eine schwache H^3 -Markierung festzustellen (Abb. 3a). Mit steigender Behandlungszeit erfolgte eine ständige Zunahme der H^3 -Actinomycin-Inkorporation, was zu einer intensiven, in allen Teilen der Knospe gleichmäßigen Markierung führte (Abb. 3b). Die Medusenknospen

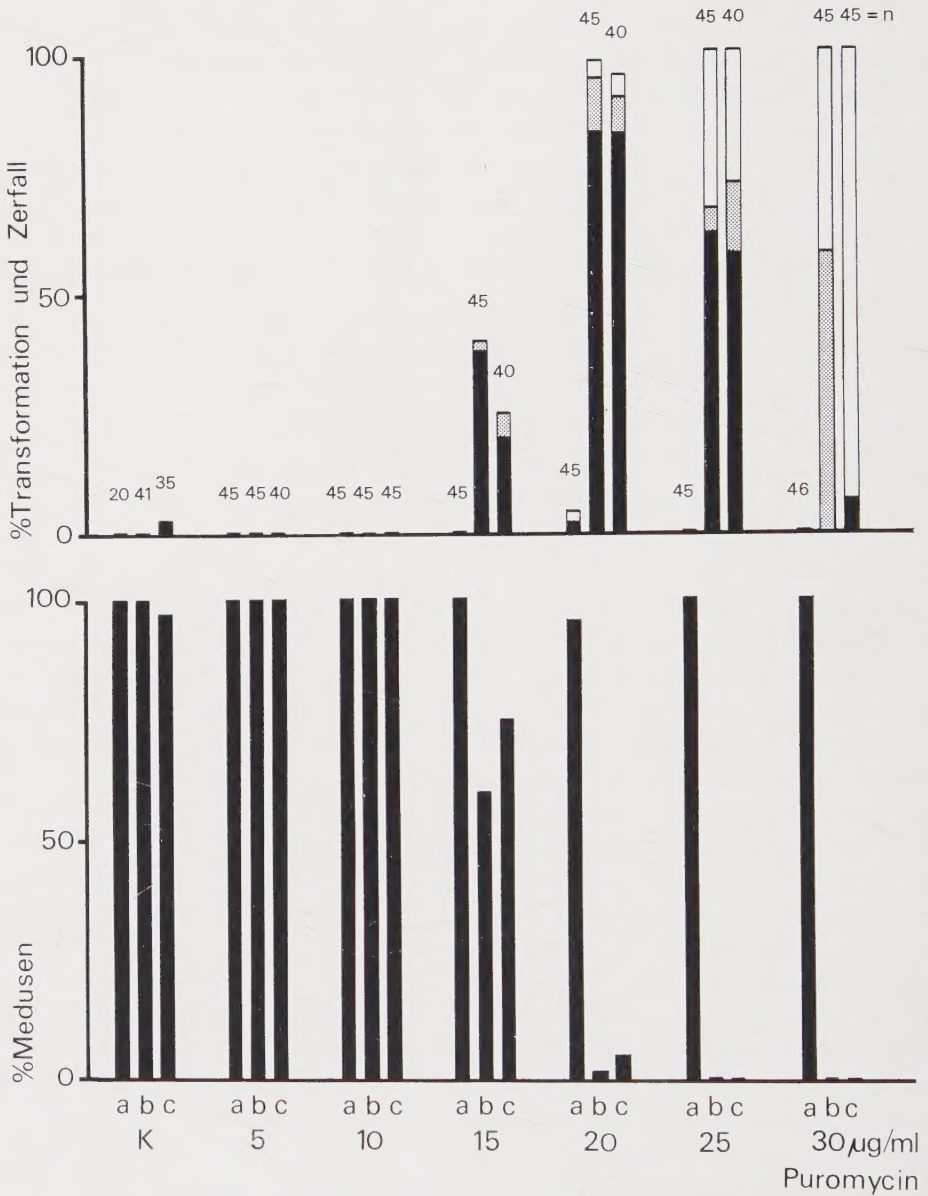


Abb. 2. a) Prozentualer Anteil isolierter Medusenknospen, die sich nach einer Behandlung mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen (5–30 µg/ml) während 6 (a), 12(b) oder 24(c) Stunden: 1. zu Stolonen umwandeln = Transformation (schwarze Säule), 2. sich bis zum Kugelstadium dedifferenzieren (punktierte Säule) oder 3. zerfielen (weiße Säule), verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe.

b) Prozentualer Anteil isolierter Medusenknospen, die sich zu Medusen entwickelten (reziproke Werte zu 2a).

wurden nach der Exposition in H^3 -Actinomycin bzw. vor ihrer Fixierung 12 Stunden in Actinomycin-freiem Meerwasser gehalten.

Gestützt auf diese Vorversuche konnte im Hinblick auf die Untersuchung der Phasenspezifität der Actinomycinwirkung (Kap. 3.2.) die Konzentration ($15 \mu\text{g/ml}$) bzw. Behandlungsdauer (12 Stunden) festgelegt werden, welche das Eindringen in die Knospen in ausreichender, jedoch nicht toxischer Menge des Agens gewährleistet.

Puromycin: Die qualitativ feststellbaren Auswirkungen der hier mit den eingangs aufgeführten Behandlungszeiten in 3 Einzelversuchen geprüften Puromycin-Konzentrationen ($5, 10, 15, 20, 25, 30 \mu\text{g}$ Puromycin/ml Meerwasser) unterschieden sich nur geringfügig von jenen des Actinomycins, d. h. 1. Die medusentypische Weiterentwicklung nahm, obwohl gegenüber den Kontrollknospen noch verzögert, einen wesentlich rascheren Verlauf als bei den im Actinomycinversuch beobachteten Isolat (Tabelle 2), wobei die so entstandenen Medusen nie Fehler oder Mißbildungen aufwiesen (Abb. 2). Dies deutet auf eine kurze, nur während der Behandlungszeit vorhandene und reversible Wirkung des Puromycins hin. 2. Im Falle der Transformation setzte diese sofort nach Abschluß der Behandlung ein, ohne daß die medusentypische Entwicklung noch bis zum nächstfolgenden Stadium weiterlief.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in der Abb. 2 zusammengestellt: Bei niederen Konzentrationen ($5, 10, 15 \mu\text{g/ml}$) zeigten die Versuchsknospen keine oder nur eine geringe Reaktion auf die Einwirkung des Agens. Bei den höchsten, getesteten Konzentrationen ($25, 30 \mu\text{g/ml}$) hingegen zerfielen viele der beobachteten Isolate. Eine hohe Transformationsrate wurde nur bei $20 \mu\text{g/ml}$ Puromycin erreicht. Diese Angaben gelten für die 12- und 24stündigen Behandlungszeiten, die sich in ihrer Wirkung kaum voneinander unterschieden, währenddem die Knospen nach der 6stündigen Exposition selbst bei höchsten Konzentrationen nicht auf die Puromycineinwirkung reagierten. Wir sehen aus diesen Ergebnissen, daß bei allen untersuchten Außenkonzentrationen die 6stündige Behandlungszeit noch keine das Entwicklungsgeschehen beeinflussende Innenkonzentration lieferte. Demgegenüber wurde jedoch bereits bei 12 Stunden Exposition die maximale Wirksamkeit des Puromycins erreicht.

Für die Untersuchung der phasenspezifischen Wirkung des Puromycins wurde, ausgehend vom Ergebnis dieses Vorversuches, eine Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ und eine Behandlungszeit von 12 Stunden gewählt.

2. Die phasenspezifische Wirkung von Actinomycin und Puromycin (Stadien 5–9)

Mit diesen Hauptversuchen sollte festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß die Transformation von isolierten Medusenknospen älterer Entwicklungsstadien zu Stolonen (FREY 1968; SCHMID 1972) durch Behinderung der Transkription (Actinomycin) bzw. Translation (Puromycin) beeinflusst wird. Hierfür wurden Medusenknospen der Stadien 5–9 (FREY 1968) unmittelbar nach ihrer Isolation vom Blastostyl der Wirkung je einer nicht variablen Konzentration von Actinomycin bzw. Puromycin unterworfen. Die Entwicklungsleistungen dieser Isolate bezüglich der medusentypischen Weiterentwicklung, bzw. Transformation zu Stolonen oder eventueller morphogenetischer Ano-

Tabelle 1. Anzahl der sich zu Medusen entwickelnder Medusen bzw. sich transformierender (Transf.) Knospen der Stadien 5—9: a) nach Isolation vom Blastostyl (KONTROLLE), b) nach Isolation und Behandlung mit Actinomycin ($15 \mu\text{g/ml}$; 12 h) (VERSUCH).

Entwicklungszeit = Durchschnittliche Entwicklungsdauer von der Isolation bis zum Medusenstadium ; Chi^2 -Test mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

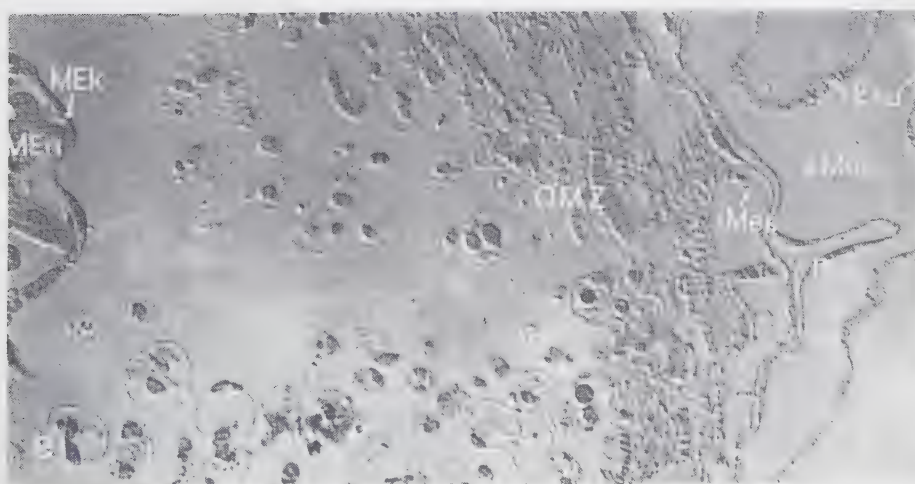
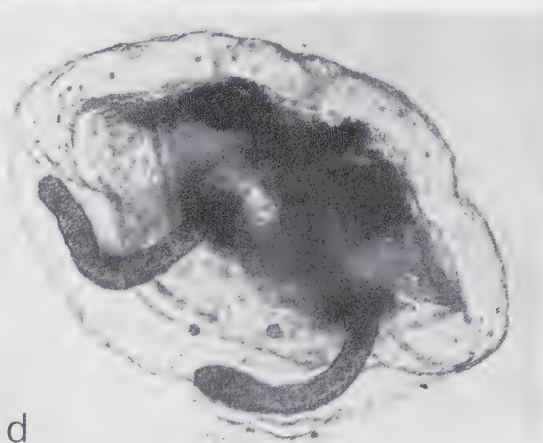
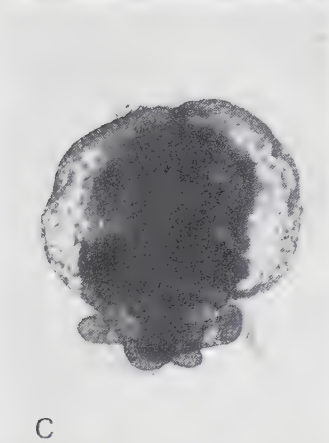
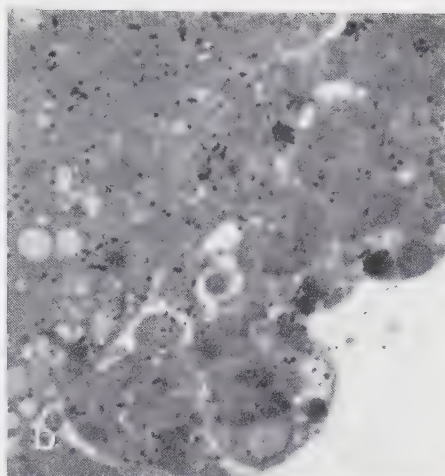
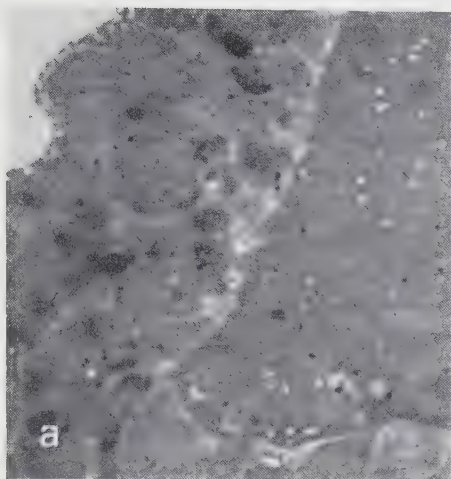
	VERSUCH			KONTROLLE			CHI ²
	Meduse		Transf.	Meduse		Transf.	
	Entw. leistung	Entw. zeit		Entw. leistung	Entw. zeit		
Stad. 5	1 1%		106 99%	82 78%	143 h	23 22%	132,4>
Stad. 6	1 1%		100 99%	98 97%	119 h	3 3%	186,4>
Stad. 7	20 17%	135 h	96 83%	113 98%	99 h	2 2%	155,2>
Stad. 8	192 97%	127 h	5 3%	197 100%	62 h	0	5,1 < 6,6
Stad. 9	196 100%	87 h	0	196 100%	36 h	0	

Abb. 3. a/b) Ergebnis a) der 2stündigen, b) der 12stündigen Exposition von isolierten Knospen des Stadiums 7 in $50 \mu\text{Ci/ml}$ H^3 -Actinomycin (Film-Expos.: 18 d).

c/d) Unvollständig entwickelte Medusen 144 Stunden nachdem sie als frischisolierte Knospen des Stadiums 8 mit $15 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin während 12 Stunden behandelt wurden.

e) Ausschnitt aus einem horizontal, median geführten Querschnitt durch eine entsprechend der in der Abb. 3 d entwickelten Meduse.

Exu = Exumbrella, MEK = Manubrium-Ektoderm, MEn = Manubrium-Entoderm, iMes = innere Mesogläa, äMes = äußere Mesogläa, QMZ = quergestreifte Muskelzellen, RdK = Radiärkanal, Sup = Subumbrellarplatte. Mikr. Vergr.: a, b, e: $100\times$; c, d: $26\times$. Aufnahme-Verfahren in e: Differential-Interferenzkontrast nach Nomarski.



malien wurde mit jenen von unbehandelten, sich im Moment der Isolation im gleichen Entwicklungsstadium befindlichen Kontrollisolation verglichen.

Kontrollen: In sämtlichen Actinomycin- und Puromycinversuchen wurde das morphogenetische Verhalten von insgesamt 1453 Kontrollen, d. h. unbehandelten, in den Stadien 5–9 isolierten Medusenknospen überwacht. Unter diesen transformierte nur ein Teil der im Stadium 5 isolierten Knospen (Actinomycin = 22%; Puromycin = 24%; Tabelle 1 und 2), während alle übrigen Isolate dieses Stadiums sowie der größte Teil der älteren (Stadien 6–9) sich zu zwar etwas verkleinerten, ansonst jedoch normalen Medusen weiterentwickelten. Die Transformationsrate isolierter Medusenknospen lag gegenüber früheren Arbeiten (FREY 1968; SCHMID 1972) vor allem in den Stadien 6 und 7 etwas tiefer (Abb. 7). Diese Kontrolltiere lieferten somit eine sichere Vergleichsbasis gegenüber den mit Actinomycin und Puromycin behandelten Versuchsknospen.

Actinomycin: Die insgesamt 717 in 5 einzelnen Versuchsserien mit Actinomycin (15 $\mu\text{g/ml}$) behandelten (12 h), isolierten Medusenknospen der Stadien 5–9 zeigten im wesentlichen die bereits im Konzentrationsversuch (Kap. 3.1.) erörterten Entwicklungsleistungen, wobei zerfallende Isolate nur ausnahmsweise auftraten und ihre Zahl ($\approx 1\%$) nicht höher lag als bei den Kontrollen, bei denen es aus unerklärlichen Gründen gelegentlich zu Desintegrationen kam.

Die sich dedifferenzierenden Knospen (Stadien 5, 6, 7) durchliefen zwar fast ausnahmslos den ganzen Transformationsprozeß, doch kam es bei vielen erst nach 600 Stunden zur Stolonenbildung. Der Entwicklungsverlauf der sich medusentypisch weiterdifferenzierenden Knospen (Stadien 8 und 9) war gegenüber jenem der Kontrollen stets verzögert (Tabelle 1), wobei die bereits erwähnten (Kap. 3.1), fehlerhaften Leistungen auftraten (Abb. 3c/d). Lediglich 31 von 196 Medusen des Stadiums 9 erreichten ohne Mißbildungen das Endstadium der Meduse.

Die quantitativen Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Transformationsrate der Versuchsknospen der Stadien 5, 6 und 7 war sehr hoch und unterschied sich in allen Stadien signifikant von denjenigen der Kontrollknospen. Bei den Stadien 8 und 9 hingegen, in denen sich praktisch 100% der Versuchsknospen zu Medusen entwickelten, ergab sich kein Unterschied im Vergleich zu den Kontrollisolaten. Obwohl bereits im Stadium 7 eine leichte Abnahme der Transformationsrate zu verzeichnen war, die sich durch die systembedingte Ungenauigkeit bei der Auswahl der einzelnen Knospenstadien erklären läßt, erfolgte der Abfall der Transformationsrate vom Stadium 7 zum Stadium 8 sehr plötzlich.

Puromycin: In 5 Versuchsserien wurden insgesamt 732 isolierte Knospen der Stadien 5–9 mit Puromycin (20 $\mu\text{g/ml}$) behandelt (12 h). Bezüglich der Entwicklungsleistung traten auch hier die bereits im Konzentrationsversuch erwähnten Erscheinungen zutage, d. h. im Gegensatz zur Actinomycinbehandlung lieferten alle sich medusentypisch entwickelnden Isolate vollständige, fehlerlose Medusen. Außerdem war die Entwicklungsverzögerung gegenüber den Kontrollen nur geringfügig und entsprach in etwa der Dauer der Behandlungszeit (Tabelle 2). Die Transformationen zu Stolonen verliefen auch wesentlich rascher als im Actinomycinversuch (Tabelle 3).

Tabelle 2. Anzahl der sich zu Medusen entwickelnder (Meduse) bzw. sich transformierender (Transf). Knospen der Stadien 5—9: a) nach Isolation vom Blastostyl (KONTROLLE), b) nach Isolation und Behandlung mit Puromycin (20 µg/ml; 12 h) (VERSUCH). Das Alter der Stadien zum Zeitpunkt der Isolation wurde nachträglich mit Hilfe der Entwicklungszeiten der Kontrollen bestimmt (siehe Text).

Entwicklungszeit = Durchschnittliche Entwicklungsdauer von der Isolation bis zum Medusenstadium; Chi²-Test mit 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit

	VERSUCH			KONTROLLE			CHI ²
	Meduse		Transf.	Meduse		Transf.	
	Entw. leistung	Entw. zeit		Entw. leistung	Entw. zeit		
Stad. 5	23 22%		80 78%	79 76%	160 h	25 24%	59,5>
Stad.5,5	3 5%		54 95%	59 100%	130 h	0	104,6>
Stad.6,5	19 12%	116 h	138 88%	154 99%	109 h	2 1%	204,3>
Stad.7,6	39 23%	85 h	134 77%	173 99%	75 h	2 1%	212,8>
Stad.8,5	76 94%	64 h	5 6%	77 96%	41 h	3 4%	0,5<
Stad.8,8	160 99%		1 1%	165 100%		0	1,0<

6,6

6,6

Die Bestimmung der Knospenstadien wurde zum Zeitpunkt der Isolation, gleich wie im Actinomycesversuch, nach den von FREY (1968) vorgeschlagenen Kriterien vorgenommen. Da dabei Ungenauigkeiten in der Auswahl der Stadien vorkommen können, ein Vergleich der Wirkungen von Actinomyces und Puromycin auf die behandelten Isolate jedoch nur sinnvoll ist, wenn auf exakt gleichalterige Medusenstadien Bezug

genommen werden kann, wurde das Alter der in den Versuchen verwendeten Knospen nachträglich nach der Entwicklungsdauer der Kontrollen (Tabelle 1 und 2) bestimmt. Das geschah unter der Annahme, daß isolierte Knospen eines bestimmten Stadiums unter gleichen Versuchsbedingungen, was für alle Kontrollisolate zutrifft, stets dieselbe Zeit bis zum Erreichen des Medusenzustandes benötigten. Um einen Vergleichsparameter zu erhalten, wurden die Entwicklungszeiten der Kontrollen im Actinomycinversuch den einzelnen Stadien zugrunde gelegt und das Alter der in andern Versuchen isolierten Knospen danach bestimmt (ACHERMANN 1976). Da bei jedem Experiment Kontroll- und Versuchsknospen desselben Stadiums zum gleichen Zeitpunkt isoliert wurden, gilt das für die Kontrolltiere bestimmte Alter zum Zeitpunkt der Isolation auch für die entsprechenden Versuchsknospen.

In den Stadien 5–7,6 lagen die Transformationsraten der Versuchsknospen weit über denjenigen der Kontrollisolate (Tabelle 2). Selbst im Stadium 5, das im Vergleich zu den älteren Stadien eine deutlich tiefere Dedifferenzierungsrate aufwies, ließ sich gegenüber den Kontrollen ein signifikanter Unterschied ermitteln. Im Gegensatz dazu stimmten in den Stadien 8,5 und 8,8 die Ergebnisse der Versuchs- und Kontrollgruppe miteinander überein, so daß also auch hier ein plötzlicher Abfall der Transformationsrate beim Übergang vom Stadium 7,6 zum Stadium 8,5 zu verzeichnen war.

3. Zum Verlauf des Transformationsprozesses

Der Transformationsprozeß (Abb. 4), dem isolierte Medusenknospen nach ihrer Trennung vom Gonozoid unterworfen sind (FREY 1968; KAKINUMA 1969; SCHMID 1972) wird bei unbehandelten jüngeren Isolaten (Stadien 5, 6, 7) durch eine fortschreitende Desintegration der medusentypischen Organe und Strukturen (Gastrovaskularsystem etc.) eingeleitet. Diese Dedifferenzierung auf dem Organ-Niveau ist von Dedifferenzierungsprozessen auf zellulärer Ebene begleitet (SCHMID 1972), die zu einer einfachen diploblastematischen Kugel führen, die sich in einer zweiten Phase des Umwandlungsprozesses zu einem Stolo ausdifferenziert, aus dem letztlich ein Polyp hervorgehen kann. Das Verhalten der einzelnen, an diesem metaplastischen Prozeß beteiligten Gewebe- und Zelltypen ist im Detail noch nicht bekannt.

Histologie: Für die Untersuchung dieses Prozesses wurden Knospen aller mit Actinomycin und Puromycin behandelter Stadien (5, 6, 7, 8, 9) zum Zeitpunkt ihrer Isolation vom Mutterpolypen, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96, 120, 144 h) des eingeleiteten Transformationsprozesses (Stadium 5, 6, 7) oder der Entwicklung zur Meduse (Stadium 8 und 9) fixiert und für die Herstellung von Semidünnschnitten weiterverarbeitet (siehe Kap. 2.2.). Die frisch isolierten Medusenknospen dienten dabei als Kontrollen, indem sie Auskunft darüber gaben, welche Zell- und Gewebetypen im betreffenden Knospenstadium bereits differenziert waren und daher im anschließenden Transformationsprozeß der Regression anheimfielen.

Da sich in dieser Art histologischer Untersuchung kaum wesentliche Unterschiede zwischen den durch Puromycin bzw. Actinomycin ausgelösten Transformationsvorgängen zeigte, erübrigt sich eine ausführliche Beschreibung beider Vorgänge. Die

folgende Darstellung beschränkt sich auf das Transformationsgeschehen der Stadien 5 und 7 des Actinomycinversuches (Abb. 4 und 5).

Stadium 5: Die in diesem Stadium isolierte Knospe besitzt distal eine Eindellung, wodurch die bereits gut entwickelten marginalen Bulben der Umbrella deutlich in Erscheinung treten (Abb. 5a). Das Innere der Knospe ist ausgefüllt mit vakuolisiertem Manubrium-Entoderm und kompaktem Glockenkern-Ektoderm, wobei die Grenzen zwischen dem späteren Manubrium-Ektoderm, der prospektiven Schwimmuskulatur und des Velums (BOELSTERLI 1977) bereits erkennbar sind. Im Entoderm sind die Anlagen des Gastrovaskularsystems, Radiärkanäle und Ringkanal, deutlich sichtbar. Vereinzelte Nesselzellen treten erstmals in der Exumbrella und im distalen Manubrium-Entoderm auf.

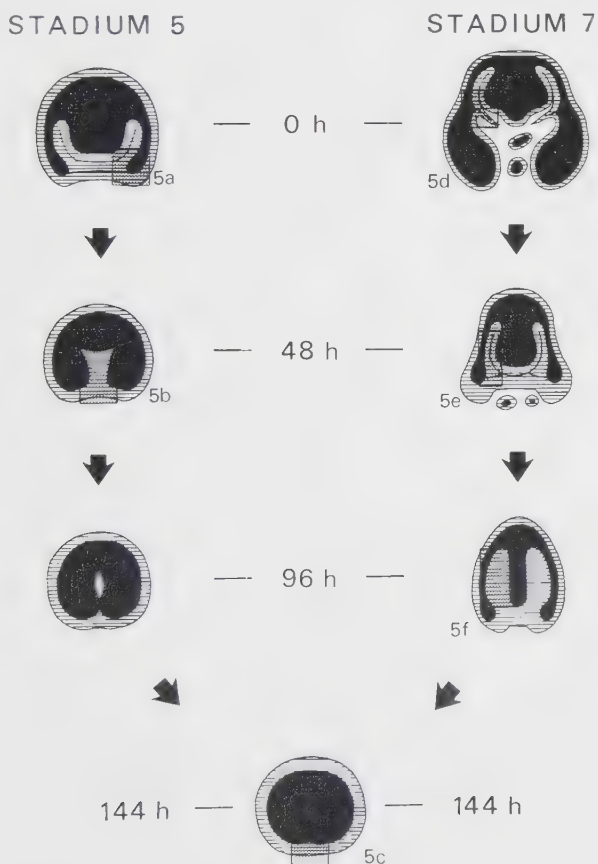


Abb. 4. Transformationsverlauf von Actinomycin-behandelten ($15 \mu\text{g/ml}$; 12 h) Knospen der Stadien 5 und 7 vom Zeitpunkt der Isolation (0 h) bis zum Kugelstadium (144 h). Die Zeichnungen wurden anhand von Semidünnschnitten angefertigt. Schwarz - Entoderm, gestrichelt - Ektoderm. Die punktierten Kästchen bezeichnen die Vergrößerungen der Abb. 5a/b/c/d/e/f.

48 Stunden nach der Actinomyeinbehandlung hat sich die Knospe dieses Stadiums infolge einer die Eindellung rückgängig machenden Verlagerung des Glockenkernmaterials bereits deutlich abgerundet. Die zuvor deutlich erkennbaren Grenzen zwischen den verschiedenen subumbrellären Zellschichten verwischen sich, wobei in diesem Bereich große, dunkle Vakuolen auftreten (Abb. 5b), die denjenigen des Entoderms ähnlich sind. In diesem Zustand sind die Anlagen der Radiär- und der Ringkanäle bereits nicht mehr sichtbar.

Nach 96 Stunden ist das Glockenkernmaterial bis auf einen kleinen Rest verschwunden oder ins äußere Ektoderm verlagert worden. Die distale, die präsumptive Glockenhöhle anzeigende Eindellung ist nur noch schwach ausgebildet, und die ektodermale Schicht dieser Region befindet sich weiterhin in einem vakuolisierten Zustand.

Nach 144 Stunden treten die Isolate in das eigentliche Kugelstadium ein (Tabelle 3), bei dem das vakuolisierte, strukturlose Entoderm von einer dicken Ektodermis umhüllt ist. Im distalen Teil der Kugel lassen sich in der normalen Medusenanlage im manubrialen Ektoderm lokalisierte Oocyten nachweisen (Abb. 5c). Ebenso sind in dieser Region bereits im Stadium 5 vereinzelt und später regelmäßig quergestreifte, noch nicht der Dedifferenzierung anheimgefallene Muskelzellen anzutreffen.

Stadium 7: Hier ist die spätere Organisation der Meduse bereits deutlich festgelegt, was u. a. durch die zunehmende Erweiterung des Subumbrellarraumes unterstrichen wird (Abb. 5d). In diesen hinein ragen nun die auswachsenden Marginal-Tentakel und das Velum. Zwischen Ektoderm und Entoderm hat sich in allen Bereichen der Anlage eine dünne Mesoglöa ausgebildet, die besonders deutlich im seitlichen Teil der Knospe in Erscheinung tritt. Dadurch wird die entodermale Subumbrellarplatte einerseits nach innen gegen die präsumptive Schwimmuskulatur, deren quergestreifte Muskelzellen bereits ausdifferenziert sind, und andererseits nach außen gegen die Exumbrella abgegrenzt. Nematocyten treten gehäuft im distalen Teil der Exumbrella, sowie vereinzelt im stark vakuolisierten Entoderm des Manubriums auf.

48 Stunden nach Behandlungsbeginn machen sich die ersten Anzeichen der beginnenden Transformation bemerkbar, indem es zunächst zu einer Umlagerung des subumbrellären Ektoderms kommt, dessen Bereiche, unter Beibehaltung ihres Differenzierungszustandes, miteinander in Kontakt treten (Abb. 5e). Durch das dadurch

Abb. 5. Vergrößerungen aus den in der Abb. 4 halbschematisch dargestellten, transformierenden Knospen der Stadien 5 (a—c) und 7 (d—f): Stadium 5: a) Marginale Bulbusregion einer frisch isolierten Knospe. b/c: Region der distalen Eindellung und des ehemaligen Glockenkernes 48 h (b) und 144 h (c) nach Behandlungsbeginn. Stadium 7: d) Ausschnitt aus der Region des Subumbrellarraumes einer frisch isolierten Knospe. e/f: Dieselbe Region 48 h (e) und 96 h (f) nach Behandlungsbeginn. Ekt = Ektoderm, Ent = Entoderm, Glk = Glockenkern, MEk = Manubrium-Ektoderm, MEn = Manubrium-Entoderm, Mes = Mesoglöa, Myf = Myofibrillen (quergestreift), Nem = Nematocyten, Ooc = Oocyte mit Kern (hell) und Nucleolus (dunkel), QMZ = quergestreifte Muskelzellen, Sup = Subumbrellarplatte, Sur = Subumbrellarraum, Ten = Tentakel, Vel = Velum. Aufnahme: Differential-Interferenzkontrast-Verfahren nach Nomarski; Mikr. Vergr.: 400×.

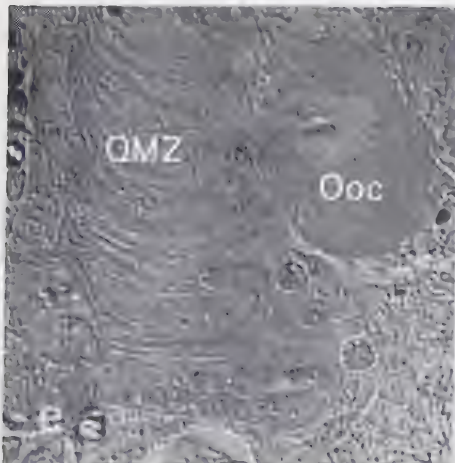
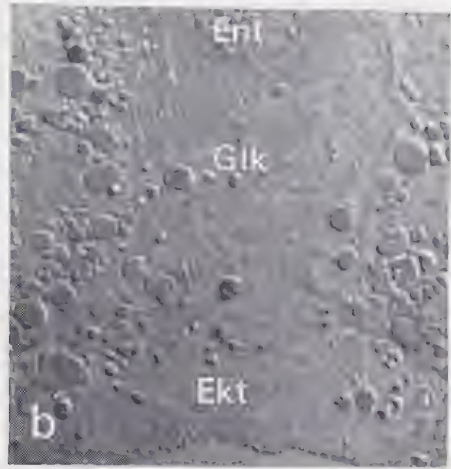


Tabelle 3. Zeitlicher Verlauf der Transformation von Knospen des Stadiums 6, die mit Actinomycin (15 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Puromycin (20 $\mu\text{g/ml}$) während 12 h behandelt wurden. Tr. stad. 1: Verlust der medusentypischen Strukturierung; Tr. stad. 2: Kugelstadium; Tr. stad. 3: Auswachsen der Stolonen.

In Klammern Anzahl der Isolate, die vor der Stolonenbildung zerfielen.

	STADIUM 6	1. TR. STAD.	2. TR. STAD.	3. TR. STAD.
PUROMYCIN				
o h	112	-	-	-
24 h	6	105	-	-
48 h	-	79	26	-
72 h	-	78	27	-
120 h	-	-	105	-
168 h	-	-	64(2)	39
216 h	-	-	42(2)	61
288-360 h	-	-	6(2)	97
ACTINOMYCIN				
o h	101	-	-	-
24 h	3	-	-	-
48 h	-	100	-	-
72 h	-	100	-	-
120 h	-	96	3(1)	-
168 h	-	52	31(1)	16
216 h	-	5	35(1)	59
288 h	-	-	-(2)	98

verursachte Verschwinden des Subumbrellarraumes kommen die marginalen Tentake der Umbrella außerhalb der Knospe zu liegen.

Nach 96 Stunden haben sich auch hier die Grenzen zwischen den Subumbrellargewebe aufgelöst. Die im Subumbrellarraum jetzt in chaotischer Anordnung vorliegenden Muskelzellen und Oocyten deuten auf eine erfolgte Durchmischung dieser Gewebe hin (Abb. 5f), die außerdem eine Verlagerung in den distalen Teil der Anlage erfahren haben. Die nach außen verschobenen Tentakel werden in diesem Zeitpunkt der Transformation resorbiert, und im entodermalen Bereich befinden sich die Radiär- und Ringkanäle in Auflösung.

Nach 144 Stunden sind die Knospen zur typischen Kugel geworden, deren Inneres ganz mit Entodermzellen aufgefüllt ist. Reste des vormaligen Subumbrellaektoderms sind im distalen Bereich zu sehen, wo vereinzelt Muskelzellen und Oocyten nachgewiesen werden können. Letztere werden z. T. abgestoßen.

Vergleich der Transformation von Actinomycin- bzw. Puromycin-behandelten Isolaten: Während die äußerlich feststellbaren Transformationserscheinungen bei den mit Actinomycin- bzw. Puromycin-behandelten Isolaten sich weder untereinander, noch gegenüber den von FREY (1968) und SCHMID (1972) beschriebenen Vorgängen unterschieden und die histologischen Untersuchungen weitgehende Übereinstimmungen lieferten, ergaben sich Differenzen zwischen den beiden durch die verschiedenen Substanzen ausgelösten Dedifferenzierungsprozessen bezüglich des zeitlichen Verlaufes (Tabelle 3).

Bei den mit Puromycin behandelten Medusenknospen (Stadium 6) setzte der Dedifferenzierungsprozeß bei 105 von 112 Knospen bereits 24 Stunden nach Behandlungsbeginn ein, wobei die Isolate das 2. Transformationsstadium, d. h. die Kugelform, bereits vollzählig nach 120 Stunden erreicht hatten. Im Gegensatz dazu entwickelten sich 98 von 101 Knospen des Actinomycinversuches zunächst in medusentypischer Richtung weiter. Erst nach weiteren 24 Stunden begann hier das Transformationsgeschehen, das im Vergleich zum Puromycinversuch verhältnismäßig langsam zum Kugelstadium führte. Die Dedifferenzierung der Stolonen hingegen setzte bei beiden Versuchsgruppen etwa zur gleichen Zeit ein.

4. Die Auswirkungen von Actinomycin und Puromycin auf die medusentypische Weiterentwicklung der isolierten Knospen

Die ältesten Stadien (8 und 9) der mit Actinomycin bzw. Puromycin behandelten Medusenknospen differenzierten sich trotz der Anwesenheit der Antibiotika zu Medusen weiter. Dabei entstanden neben völlig normal ausgebildeten Medusen auch solche, die durch schwerwiegende Mißbildungen und fehlende Organe gekennzeichnet waren (Abb. 3c/d). Letztere stellen die Kategorie dar, die bei der 12stündigen Expositionszeit der Knospen nur im Fall der Actinomycin-Behandlung auftrat und gleichzeitig eine gegenüber den Kontrollen stark verlängerte Entwicklungszeit aufwies.

Dabei manifestierten sich die morphologisch sichtbaren Fehlleistungen bei den verschiedenen Medusen unterschiedlich stark. Am häufigsten war eine gegenüber dem Normalfall verminderte Anzahl der marginalen Bulben und Tentakel (Abb. 3d) und damit auch der entsprechenden Radiärkanäle (Abb. 3e) ausgebildet. In anderen Fällen fand trotz einer massiven Quellung der äußeren Mesoglöa keine Entfaltung der subumbrellären Gewebe statt (Abb. 3c). Auch bei diesen Medusen waren Organe, wie z. B. Velum, Radiär- und Ringkanäle, unvollständig entwickelt. Die histologischen Untersuchungen zeigten, daß vielerorts die innere Mesoglöa nicht oder nur teilweise gequollen war und die daran anschließende Schwimmuskulatur anstelle der geordneten Gewebestruktur ein chaotisches Durcheinander von Zellen aufwies (Abb. 3e). Allgemein schienen die Mißbildungen die Folge einer stark verzögerten, noch nicht abgeschlossenen Entwicklung gewisser Medusenteile zu sein, was zu einer mehr oder weniger großen Störung der gesamten Medusenorganisation führte.

Der Umstand, daß die Wirkung des Puromycins zeitlich auf die Behandlungsdauer beschränkt bleibt (Kap. 3.1.), ermöglichte es, die Entwicklung experimentell unterschiedlich stark zu verzögern und damit einen möglichen Zusammenhang zwischen

verlängerter Entwicklungszeit und morphogenetischer Fehlleistung zu erkennen. Zu diesem Zwecke wurden isolierte Medusenknospen (Stadium 7) einer niederen, die Transformation nicht auslösenden Puromycinkonzentration ($10 \mu\text{g/ml}$) während 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden ausgesetzt, anschließend in normales Meerwasser gebracht und deren Entwicklungsleistung mit derjenigen einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Die Resultate des Versuches sind in der Abb. 6 graphisch aufgezeichnet, wobei die verschiedenen Entwicklungszeiten der Knospen als Kurve, die Differenzierungsleistungen, d. h. die Anzahl und die Art der entstandenen Medusen, als Histogramm dargestellt sind. Die Entwicklungszeit der Versuchsknospen war gegenüber derjenigen der Kontrollisolaten (81 Stunden) stark verlangsamt und stieg mit länger-dauernder Behandlungzeit asymptotisch gegen ein Maximum an. Auf die Anzahl der entstandenen Medusen war der Einfluß des Puromycins selbst bei der maximalen Verzögerung gering. Während sich bei der 24- bis 96stündigen Expositionzeiten der Knospen zwischen 90 und 100% zu Medusen differenzierten, sank deren Entstehungsrate erst bei der 120stündigen Behandlungsdauer auf 73%. Zunehmend wiesen jedoch viele der entstandenen Medusen Mißbildungen auf, identisch denjenigen

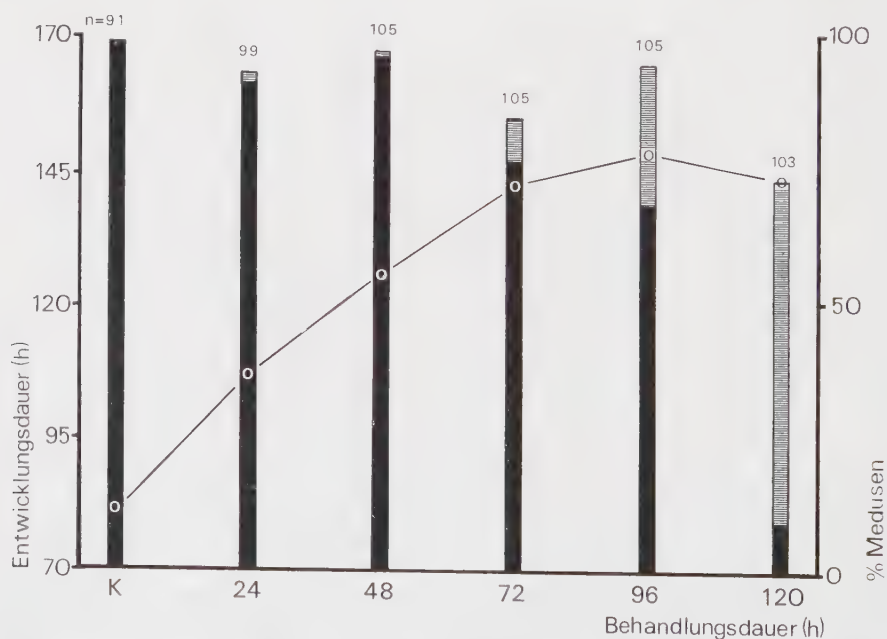


Abb. 6. Durchschnittliche Entwicklungsdauer (Kurve) und entsprechende Entwicklungsleistung, dargestellt als prozentuale Entwicklungsrate zu Medusen (Histogramm), von Knospen des Stadiums 7, die mit Puromycin ($10 \mu\text{g/ml}$) während 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden behandelt wurden, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe (K). Schwarze Säule: % Anteil vollständig entwickelter Medusen, gestrichelte Säule: % Anteil fehlerhaft entwickelter Medusen, n = Anzahl beobachteter Medusenknospen.

im Actinomycinversuch (Abb. 3c/d). Die Beobachtung zeigte, daß immer jene Knospen von der morphogenetischen Fehlleistung betroffen wurden, bei denen während oder kurz nach der Puromycinbehandlung die Quellung der Mesogloä erfolgte.

Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollversuche mit isolierten, unbehandelten Medusenknospen von *Podocoryne carnea* M. Sars vermochten frühere Befunde (FREY 1968; SCHMID 1972) vollumfänglich zu bestätigen: Während sich junge Stadien nach der Isolation vom Gonozoid größtenteils dedifferenzierten und in einem weiteren Entwicklungsschritt zu Stolonen und Polypen umwandelten (Transformation), erlangten die Knospen älterer Stadien zunehmend die Fähigkeit sich im isolierten Zustand autonom zu vollwertigen Medusen weiterzuentwickeln (Abb. 7). Das Hauptanliegen dieser Arbeit war es, einen Einblick in die diesem morphogenetischen Verhalten zugrunde liegenden Steuerungsmechanismen durch Eingriffe in die Protein-synthese, d. h. durch Hemmung der Transkription mit Actinomycin (BRACHET et al. 1964; REICH et al. 1967; CLARKSON 1969; LESH-LAURIE 1972, 1974; KERSTEN et al. 1974; SOBELL 1974) und der Translation mit Puromycin (YARMOLINSKY et al. 1959; BRACHET 1963, 1964; NATHANS 1967; BOON-NIERMEYER 1975) zu gewinnen. Mit Nebenwirkungen dieser beiden Antibiotika auf den Intermediärstoffwechsel, wie Atmung, Glycolyse usw., ist durchaus zu rechnen (SOEIRO et al. 1966; NATHANS 1967; SCHWARTZ 1973). Falls überhaupt vorhanden, haben sie jedoch auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen wesentlichen Einfluß ausgeübt, traten doch beim Vergleich der Befunde der Actinomycin- und Puromycinversuche die spezifischen Wirkungen beider Antibiotika deutlich in Erscheinung (Abb. 7; Tabelle 3).

Eine Injektion der Antibiotika war der Kleinheit der Objekte, bzw. der damit verbundenen Verletzungsgefahr wegen ausgeschlossen. Die Substanzen wurden deshalb

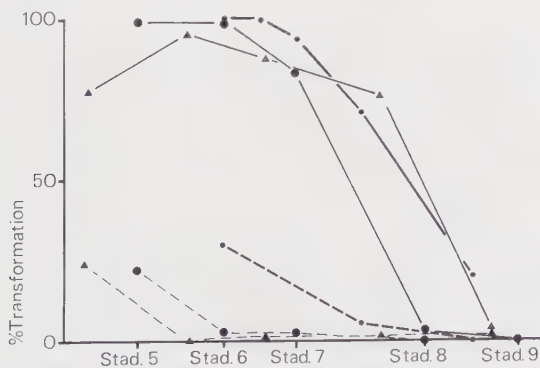


Abb. 7. Prozentualer Anteil isolierter Medusenknospen der Stadien 5–9, die sich nach einer Behandlung mit 15 µg/ml Actinomycin (●) bzw. 20 µg/ml Puromycin (▲), sowie nach Traumatization (SCHMID 1972) (*) zu Stolonen umwandelten = Transformation. Entsprechende Daten siehe Tabelle 1 und 2. Abszisse: Einteilung der Knospenstadien 5–9. Ordinate: % Transformation. a) der behandelten Versuchsknospen —, b) der unbehandelten Kontrollknospen ---.

dem Meerwasser beigelegt. Da die Knospen von einer Peridermhülle umgeben sind, bestand die Gefahr, die Substanzen würden diese Barriere nicht, oder nur in ungenügenden Mengen überwinden. Daß sowohl Actinomycin als auch Puromycin in die Knospen eindringen, dafür zeugen folgende Beobachtungen: Die Wirkungen beider Antibiotika erwiesen sich als von deren Konzentrationen und den Expositionszeiten der Isolate (Abb. 1/2) abhängig. Im weiteren ergab die Inkubation der Knospen mit H^3 -Actinomycin (ENESCO et al. 1974; CLEFFMANN et al. 1974) bereits nach kurzer Behandlungszeit eine deutliche Markierung der Zellen und Zellverbände (Abb. 3a/b). Diese Versuche zeitigten außerdem ein nicht unwesentliches Nebenergebnis. Während bei *Hydra* ein präferentieller Einbau bzw. eine lokale Wirkung des Actinomycins in der subhypostomialen Gegend beobachtet wurde (LESH-LAURIE 1974), ließ sich eine vergleichbare regionalisierte Wirkungsweise in der Medusenknospe von *Podocoryne carnea* nicht nachweisen, denn die autoradiographisch ermittelte Markierung als Folge des H^3 -Actinomycins-Einbaus in die Zellen erwies sich als gleichmäßig über die Knospe verteilt, d. h. in der zentralen Glockenkernregion (Glockenkern), die möglicherweise während der Medusenentwicklung als „Organisator“ wirksam ist, war die Markierung ebenso intensiv wie in den praesumptiven Exumbrella- und Bulbenregionen. Dies bedeutet, daß die Voraussetzungen für die Hemmung der Transkription in allen Bereichen der Medusenknospe identisch waren.

Die in den Stadien 5, 6 und 7 isolierten Medusenknospen zeigten unter der Wirkung von Actinomycin bzw. Puromycin wesentlich höhere Transformationsraten als die unbehandelten Kontrollen, d. h. die Umwandlung der Medusenanlagen zu Stolonen wurde durch die Hemmung der Transkription bzw. Translation begünstigt. Stadium 8–9 jedoch bildete, wie dies bereits Experimente mit traumatisierten Knospen gezeigt hatten (SCHMID 1972), eine unüberwindbare Grenze, jenseits der die isolierten Anlagen mit keinem der bisher geprüften Mittel zur regressiven Entwicklung veranlaßt werden konnten (Abb. 7), obwohl die strukturelle Differenzierung der medusentypischen Zellen bereits wesentlich früher abgeschlossen ist (Abb. 5d). Von dieser kritischen Schwelle an scheint der medusentypische Determinations- bzw. Differenzierungszustand irreversible festgelegt zu sein, wofür sich die folgende Interpretation anbietet: Für den strukturellen Aufbau der Meduse ist eine intensive Proteinsynthese notwendig, deren Störung einen sofortigen Zusammenbruch des bereits erreichten Organisationszustandes zur Folge hat. Zur Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung des endgültigen Differenzierungszustandes hingegen bedarf es keiner weiteren Syntheseprozesse. Der Übergang vom labilen in den stabilen Medusenzustand scheint dabei zeitlich nicht mit der Vollendung der strukturellen und ultrastrukturellen Differenzierung der medusentypischen Zellen zusammenzufallen (Abb. 5d). Die Faktoren, die für diesen Entwicklungsschritt, d. h. für die Stabilisierung des Differenzierungszustandes verantwortlich zeichnen, sind z. Z. Gegenstand laufender Untersuchungen (SCHMID 1976a, 1976b; BÄRTSCH 1977).

Allem vorab scheint der Quellungsprozeß der Mesogloä (SCHMID 1972) eine wesentliche Veränderung im zellulären Milieu der Knospe zu bewirken. Folgende Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen diese Vermutung: Isolierte Knospen, die sich trotz

der Actinomycinbehandlung zu Medusen differenzierten, zeigten, neben einer gegenüber den Kontrollen stark verzögerten Entwicklungszeit, strukturelle Mißbildungen und Entwicklungsfehler. Vermutlich beruhen diese darauf, daß Actinomycin eine interkalierende Bindung mit der DNS eingeht (MÜLLER et al. 1968; SOBELL 1974), die bei Abwesenheit des Agens nur langsam rückgängig gemacht wird, so daß auch nach der eigentlichen Behandlungszeit in den Zellen Syntheseprozesse verlangsamt oder behindert werden. Mit Puromycin, dessen Wirkung sich durch einen erhöhten Grad an Reversibilität auszeichnet, kann ein gleiches Ergebnis nur dann erzielt werden, wenn die isolierten Knospen bis zur Vollendung ihrer Entwicklung andauernd mit einer niederen Puromycindosis behandelt werden. Eine kürzere, vor dem Quellungsprozeß der Mesoglöa bereits abgeschlossene Puromycin-Behandlung führte ausnahmslos zu völlig normalen Medusen. Daraus ist ersichtlich, daß an der kritischen Entwicklungsschwelle (Stad. 8–9) nicht nur die Stabilisierung der medusentypischen Strukturen stattfindet, sondern daß jenseits dieser Schwelle jede Weiterdifferenzierung unvollständig ausgebildeter Organe unmöglich wird. Inwieweit dieser Entwicklungsstillstand für den Alterungsprozeß verantwortlich gemacht werden kann, muß in weiteren Experimenten abgeklärt werden.

Im Verlaufe des zu Stolonen zurückführenden Transformationsprozesses werden die ektodermalen Gewebe des Subumbrellarraumes von ihrer ursprünglichen Lage nach und nach ins exumbrelläre Ektoderm verschoben, wobei die Zellen ihren zuvor erreichten Differenzierungszustand wieder preisgeben (Abb. 4 und 5). Während sich nach morphologischer und histologischer Beurteilung keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsserien einstellten, erwies sich der zeitliche Verlauf der Transformation nach Behandlung mit dem irreversibel wirkenden Actinomycin (siehe oben) als stark verzögert (Tabelle 3). Diese Beobachtungen stellen einen Hinweis dafür dar, daß bereits während der ersten Phasen der Transformation Proteinsyntheseprozesse abspielen, die vermutlich gewissen lytischen Vorgängen sowie intensiven, an transformierenden Knospen gut sichtbaren Zellbewegungen im Subumbrellarraum dienen. Es bleibt vorderhin noch unklar, welches die Ursachen dafür sind, daß, nach der Unterbrechung der Proteinsynthese durch die Antibiotika, plötzlich Syntheseschritte einsetzen, die dem eingeleiteten, medusogenen Entwicklungsgeschehen entgegenwirken. Weitere Kenntnisse zum Problem der Identität der medusenstabilisierenden Faktoren, welche im Normalfall die regressive Entwicklung verhindern, sind für die Beantwortung dieser Frage notwendig.

Die bis zum Stadium 8–9 nachgewiesene Transformationsbereitschaft der isolierten Medusenknospen bekräftigt die morphogenetische Plastizität, die für alle Realisationsstufen dieser Organismen charakteristisch ist. Demgegenüber stellt die Stabilisierung des Medusengewebes insofern ein Sonderfall dar, als, von wenigen Ausnahmen abgesehen (FREY 1968; SCHMID 1972), dadurch den im medusentypischen Sinn differenzierten Zellen der Rückweg zur stolonialen bzw. polypoiden Stufe versagt bleibt. Trotz dieser Einschränkungen bleibt die Regenerationsfähigkeit der Meduse erhalten (SCHMID et al. 1971; SCHMID et al. 1976), wobei sich die diesbezüglichen Leistungen jedoch stets im Rahmen der medusoiden Organisation abspielen. Die Frage, ob diese Einengung

der Entwicklungspotenzen auf eine Erscheinungsform, d. h. die Meduse, die sich bis jetzt auch in Kombinationsexperimenten mit Polypen- und Stolonengewebe stets als die dominierende erwies (in Vorbereitung), von intra- oder extrazellulären Komponenten gesteuert wird, scheint durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leichter beantwortbar zu sein. Die Tatsache, daß das Aufrechterhalten des medusentypischen Zustandes von proteosynthetischen Prozessen unabhängig ist, spricht für den Einfluß von extrazellulären Faktoren.

Zusammenfassung

Isolierte Medusenknospen der Stadien 5, 6 und 7 (FREY 1968) von *Podocoryne carnea* M. Sars wandelten sich bei Behandlung mit 15 µg/ml Actinomycin, bzw. 20 µg/ml Puromycin im Rahmen eines metaplastischen Dedifferenzierungsprozesses (Transformation) zu Stolonen um, während sich unbehandelte Kontrollknospen derselben Stadien zu normalen Medusen weiterentwickelten. Auf zellulärem Niveau ließen sich keine Unterschiede zwischen dem durch Actinomycin oder Puromycin ausgelösten Transformationsprozeß erkennen. Dieser begann mit dem Verschmelzen der verschiedenen differenzierten, ektodermalen Subumbrellagewebe, die sich zunehmend dedifferenzierten und sich gleichzeitig ins exumbrelläre Ektoderm verschoben. Der zeitliche Ablauf dieses Umwandlungsprozesses war nach der Actinomycinbehandlung in der Frühphase verzögert. Ab dem frühen Stadium 8 konnte mit Actinomycin keine Transformation mehr eingeleitet werden, während dies mit Puromycin bis in die späte Phase dieses Stadiums noch möglich war. Damit wurde die von SCHMID (1972) postulierte Dedifferenzierungsschwelle bestätigt, wonach in dieser Phase der Entwicklung der medusentypische Differenzierungszustand irreversibel stabilisiert wird. Das Aufrechterhalten der einmal erreichten Entwicklungsform scheint demnach von aktiven Proteinsyntheseprozessen unabhängig zu sein. Bei Medusen, die sich trotz der Behandlung mit Actinomycin ausdifferenzierten, traten Mißbildungen auf, oder es fehlten ihnen ganze Organe oder Organteile. Der gleiche Effekt ließ sich bei den mit Puromycin behandelten Knospen erzielen, wenn sie mit einer niederen Antibiotikakonzentration bis über den Quellungsprozeß der Mesogloia hinaus behandelt wurden. Damit kann gezeigt werden, daß eine Weiterentwicklung unvollständig ausdifferenzierter Medusenorgane nach Erreichen der Stabilitätsgrenze nicht mehr möglich ist.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. TARDENT für die Anregung und verständnisvolle Leitung der Arbeit. Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung des „Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung“ (Gesuch 3.548.075) durchgeführt.

Literatur

- ACHERMANN, J., und TARDENT, P.: Der Einfluß von Actinomycin und Puromycin auf die späte Medusenentwicklung von *Podocoryne carnea* M. Sars. Rev. suisse Zool. **83** (1976), 970—975.
- AVSET, K.: The development of the medusa *Podocoryne carnea* M. Sars. Nytt. Mag. Zoo. **10** (1961) 49—56.
- BÄRTSCH, U.: Der Einfluß von Actinomycin D, Collagenase und Kulturmedium auf die Entwicklungsleistungen von isolierter quergestreifter Muskulatur von *Podocoryne carnea* M. Sars. Diplomarbeit, Zool. Inst. Univ. Zürich (1977) unveröffentlicht.
- BERRILL, N. J.: Growth and form in gymnoblastic hydroids. VI. Polymorphism within the hydractinidae. J. Morph. **92** (1953), 241—272.

- BOELSTERLI, U.: An electron microscopic study of early developmental stages, myogenesis, oogenesis and cnidogenesis in the anthomedusa *Podocoryne carnea* M. Sars. J. Morph. **154** (1977), 259—290.
- BOON-NIERMEYER, E. K.: The effect of Puromycin on the early cleavage cycles and morphogenesis of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Wilhelm Roux' Archiv **177** (1975), 29—40.
- BRACHET, J.: Effects of Puromycin on morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea*. Nature (London) **199** (1963), 714—715.
- DENIS, H., and DE VITRY, F.: The effects of Actinomycin D and Puromycin on morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea*. Develop. Biol. **9** (1964), 398—434.
- CLARKSON, S. G.: Nucleic acid and protein synthesis and pattern regulation in *Hydra* II. Effect of inhibition of nucleic acid and protein synthesis on hypostome formation. J. Embryol. exp. Morph. **21** (1969), 55—70.
- CLEFFMANN, G., FEHRENDT, I., and BEHRENDT, W.: The rate of uptake of ³H-Actinomycin during the cell cycle of *Tetrahymena*. Exptl. Cell Res. **87** (1974), 139—142.
- ENESCO, H. E., and MAN, K. H.: Nucleolar DNA in sea urchin oogenesis studied by ³H-actinomycin D binding. Exptl. Cell Res. **86** (1974), 395—398.
- FREY, J.: Die Entwicklungsleistungen der Medusenknospen und Medusen von *Podocoryne carnea* M. Sars nach Isolation und Dissoziation. Wilhelm Roux' Archiv **160** (1968), 428—464.
- KAKINUMA, Y.: On the differentiation of the isolated Medusa bud of the hydrozoans *Cladonema uchidai* und *Cladonema sp.* Bull. mar. biol. Stat. Asamushi **13** (1969), 169—172.
- KERSTEN, H., and KERSTEN, W.: Inhibitors of nucleic acid synthesis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1974.
- KÜHN, A.: Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsbeziehungen der Hydrozoen. I. Teil: Die Hydroiden. Ergebn. Fortschr. Zool. **4** (1914), 1—284.
- LESH-LAURIE, G. E., and HANG, L.: Tentacle morphogenesis in *Hydra*. I. The morphological effect of Actinomycin D. Wilhelm Roux' Archiv **169** (1972), 314—334.
- Tentacle morphogenesis in *Hydra*: A morphological and biochemical analysis of the effect of Actinomycin D. Amer. Zool. **14** (1974), 591—602.
- MÜLLER, W., and CROTHERS, D. M.: Studies of the binding of Actinomycin and related compounds to DNA. J. Mol. Biol. **35** (1968), 251—290.
- NATHANS, D.: Puromycin. In: Antibiotics I, Mechanism of action, p. 259 (ed. by GOTTLIEB, D., and P. D. SHAW). Springer Verlag, New York 1967.
- REICH, E., and GOLDBERG, I. H.: Actinomycin and nucleic acid function (a review). In: Progress in nucleic acid research and molecular biology, vol. III, p. 183 (ed. by DAVIDSON, J. N., and W. E. COHN). Academic Press, New York 1964.
- A. CERAMI, and D. C. WARD: Actinomycin. In: Antibiotics I, Mechanism of action p. 714 (ed. by GOTTLIEB, D., and P. D. SHAW). Springer-Verlag, New York 1967.
- SCHMID, V.: Untersuchungen über Dedifferenzierungsvorgänge bei Medusenknospen und Medusen von *Podocoryne carnea* M. Sars. Wilhelm Roux' Archiv **169** (1972), 281—307.
- Structural alterations in cultivated striated muscle cells from Anthomedusae (Hydrozoa). A metaplasiaic event. Exptl. Cell Res. **86** (1974), 193—198.
- Cell transformation in isolated striated muscle of Hydromedusae independent of DNA synthesis. Exptl. Cell Res. **94** (1975), 401—408.
- SCHMID, B., SCHNEIDER, B., STIDWILL, R., and BAKER, G.: Factors effecting manubrium-regeneration in Hydromedusae (Coelenterata). Wilhelm Roux's Archiv **179** (1976 a), 41—56.
- The transformational potential of striated muscle in Hydromedusae. Develop. Biol. **49** (1976 b), 508—517.
- and TARDENT, P.: The reconstititional performances of the Leptomedusa *Campanularia jonstoni*. Marine Biology, **8** (1971), 99—104.
- SCHWARTZ, R. S.: Control of Glutamine synthetase synthesis in the embryonic chick neural retina. A caution in the use of Actinomycin D. J. Biol. Chem. **248** (1973), 6426—6435.
- SOBELL, H. M.: How Actinomycin binds to DNA. Scientific American **231/2** (1974), 82—91.

- SOEIRO, R., and AMOS, H.: mRNA half-life measured by use of Actinomycin D in animal cells — a caution. *Biochim. Biophys. Acta* **129** (1966), 406—409.
- TARDENT, P.: Coelenterata, Cnidaria. In: *Morphogenese der Tiere* (Ed.: F. SEIDEL). Gustav Fischer Verlag, Jena 1978.
- YARMOLINSKY, M. B., and DE LA HABA, G. L.: Inhibition of Puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **45** (1959), 1721—1729.

Manuskripteingang: 10. Mai 1978.

Anschrift des Verfassers: JOSEF ACHERMANN, Zoologisches Institut der Universität Zürich, Künstlergasse 16, CH - 8006 Zürich.

Curriculum Vitae

Am 19. September 1947 wurde ich, JOSEF ACHERMANN, in meiner Bürgergemeinde Richenthal (LU) geboren. Nach dem Besuch der Primarschule im Heimatdorf trat ich 1959 in das Kollegium in Schwyz ein, wo ich die Mittelschule 1967 mit der Maturität Typ A abschloß. Im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich mit Hauptfach Zoologie. Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Kurse bei folgenden Dozenten: BIEGERT, BIRNSTIEL, BILLETER, BURLA, BÜSSER, CHEN, CHRISTEN, COOK, EUGSTER, GRABER, HADORN, HAMPEL, HEDIGER, HOHL, HUNSPERGER, JUNGEN-HAUSCHTECK, KUBIK, KUMMER, LEEMANN, NÖTHIGER, OSWALD, RAST, ROHWEDER, SCHLITTLER, SCHMID, STÜSSI, TARDENT, THOMAS, TOBLER, VAN DER WAERDEN, WAGNER, WALDMEIER, WANNER, WEHNER, WEISSMANN, WOODTLI und ZISWILER.

1972 bestand ich die Diplomprüfung. Anschließend war ich als Assistent an der Universität Zürich tätig. Die vorliegende Arbeit stand unter der Leitung von Prof. Dr. P. TARDENT.

